

氏名	山本 大介	
学位	博士	
専門分野の名称	歯学	
学位授与番号	博甲第4723号	
学位授与の日付	平成25年3月25日	
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)	
学位論文題目	ヒト歯肉線維芽細胞における IL-6 および可溶性 IL-6 受容体誘導性 angiogenin 産生に血管新生阻害物質 terrein が及ぼす効果に関する研究	
学位論文審査委員	滝川 正春 教授	森田 学 教授
	高柴 正悟 教授	

学位論文内容の要旨

【緒言】

慢性炎症は、生活習慣病、癌、自己免疫疾患、さらに神経疾患等の発症および進展に深く関与することが今日知られている。慢性炎症におけるプロセスには、免疫担当細胞の浸潤、血管新生、組織のリモデリング、そして線維化がある。近年、慢性炎症の波及に必須な幼若な毛細血管の新生をターゲットにした研究が報告され始めている。

血管新生誘導因子の一つである angiogenin は、ヒト結腸癌細胞株 HT-29 の培養上清から単離されたアミノ酸 123 個からなる分子量 14.4 kDa の血管新生誘導因子であり、リボヌクレアーゼ活性を持ち、リボヌクレアーゼ A (RNase A) と 33 % の相同性があることが報告されている。そして、癌の増殖や転移に関与する血管新生において中心的な役割を果たすと考えられ、近年では、糖尿病や関節リウマチに代表される慢性炎症性疾患の発症や進展に angiogenin の関与が示唆され始めている。さらに、口腔内の慢性炎症性疾患である歯周炎罹患患者の歯肉溝滲出液中においても、angiogenin の産生が亢進するとの報告がある。このように angiogenin が慢性炎症性疾患の発症および進展にも関与する可能性が示唆されるものの、詳細なメカニズムは未だ不明な点が多い。

一方、この angiogenin の産生を特異的に阻害する物質として報告されているものに、分子量 154.16 の有機物である terrein がある。これは、麹黴の仲間である *Aspergillus terreus* の代謝産物として発見されたもので、天然抽出物は前立腺癌細胞由来の LNCaP-CR 細胞における angiogenin の産生を有意に抑制する一方で、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の産生には影響を及ぼさないことが報告されている。

本研究では、口腔内の慢性炎症性疾患である歯周炎の病態に angiogenin が関与すると仮定し、歯周組織を主に構築する歯肉線維芽細胞を用いて、各種炎症性サイトカインが angiogenin の産生性に及ぼす影響を検討した。さらに、有機化学的に合成した(+)-terrein を用いて、angiogenin の産生を制御することが可能かどうか検討した。

【材料および方法】

1. 細胞および培養: ヒト単球系細胞株 THP-1 は、ウシ胎児血清を 10 % の割合に含む RPMI1640 を用いて、37 °C、5 % CO₂ 存在下で培養した。そして、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 最終濃度 10 nM) でマクロファージ様細胞へ分化させた。また、ヒト歯肉線維芽細胞 (HGFs) は、ウシ胎児血清を 10 % の割合に含む DMEM 培地を用いて、37 °C、5 % CO₂ 存在下で培養した。
2. 炎症性サイトカイン: リコンビナントヒト IL-6 (IL-6)、リコンビナントヒト可溶性 IL-6 受容体 (sIL-6R)、リコンビナントヒト TNF- α (TNF- α) およびリコンビナントヒト IL-1 β (IL-1 β) を用いた (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)。

3. (+)-terrein の合成: (+)-terrein は, Altenbach らの報告を一部改変し, 有機化学的に合成したものをを用いた (岡山大学大学院自然科学研究科工学部 化学生命系学科 合成プロセス化学研究室, 萬代大樹博士から供与)。合成した(+)-terrein の立体構造は, ^1H および ^{13}C の核磁気共鳴 (NMR) を用いた炭素骨格によって, また高分解能質量分析 (FAB) を用いた分子量測定によって, 確認されている。また, 高速液体クロマトグラフィーによる光学純度 (>98% 鏡像体過剰率) と比旋光度の比較によって, 天然物と同一の鏡像異性体であることも確認されている。
4. (+)-terrein の細胞障害性の検討: HGFs に(+)-terrein を添加した際の細胞増殖活性への影響と細胞数への影響は, MTT 法および蛍光免疫染色法で調べた。
5. 産生された angiogenin および VEGF の定量: THP-1 及び HGFs に(+)-terrein (10 と 20 μM) を 30 分間作用させ, IL-6 および sIL-6R (各々 0~50 ng/ml), TNF- α および IL-1 β (ともに 0~1 ng/ml) を添加した。培養上清中へ産生された angiogenin および VEGF 量は, 市販の ELISA キット (R&D) を用いて測定した。
6. IL-6/sIL-6R 刺激時における細胞内シグナル伝達系に及ぼす影響の検討: 上記 5 での条件下での細胞内シグナル伝達系の変化は, ウェスタンブロット法を用いて検出した。
7. 統計処理: 各結果は, 対応のない群間の Student's *t*-test を用いて検定した。なお, *p* 値が 0.05 以下をもって有意差ありと判定した。

【結果】

1. HGFs は, angiogenin を恒常的に産生しており, その産生は IL-6/sIL-6R の刺激によって亢進し, TNF- α によって抑制され, IL-1 β は影響を及ぼさなかった。なお, THP-1 は, angiogenin を産生しなかった。
2. (+)-terrein は 20 μM までは細胞障害性を示さず, IL-6/sIL-6R 添加によって亢進した angiogenin の産生を抑制し, さらに IL-6/sIL-6R および IL-1 β 添加によって亢進した VEGF の産生を抑制した。また, IL-6/sIL-6R 添加によって誘導された STAT3, ERK1/2, そして JNK1/2 のタンパク質のリン酸化を抑制した。

【考察】

急性炎症期に産生が亢進する TNF- α は HGFs における angiogenin の産生を抑制した。血管新生因子である angiogenin は腫瘍増殖に関与する因子となることを考慮すると, 腫瘍壊死因子としての TNF- α がその産生を抑制するのは生体反応として自然なのかもしれない。しかし, その抑制メカニズムは不明であり, 今後検討が必要である。

一方, 慢性炎症期に産生が亢進する IL-6/sIL-6R は HGFs における angiogenin の産生を亢進した。HGFs は IL-6/sIL-6R の刺激により, VEGF の産生を亢進して, 血管新生を惹起し, 歯周炎の病態悪化に関与する可能性があることが報告されている。また, angiogenin は VEGF による血管新生も制御する可能性があるという報告もあることから, angiogenin が歯周炎の病態悪化にも深く関与することが示唆される。

今回用いた(+)-terrein は, 組織構築の一つである線維芽細胞に対して IL-6/sIL-6R 誘導性 angiogenin の産生, そして VEGF の産生を抑制した。すなわち, (+)-terrein には癌組織周囲に存在する正常組織からの血管新生誘導因子の提供を阻害する効果が期待できると考える。

本研究結果から, (+)-terrein を用いることによって angiogenin による血管新生を制御することができれば, 癌領域や慢性炎症領域における angiogenin を起点とした新しい治療ターゲット開発への一助になると考える。

【結論】

HGFs において angiogenin は恒常的に産生されており, IL-6/sIL-6R 添加によって有意にその産生が亢進した。一方, (+)-terrein は IL-6/sIL-6R 誘導性 angiogenin の産生亢進を無添加時と同程度まで抑制した。

学位論文審査結果の要旨

慢性炎症は、生活習慣病、痛、自己免疫疾患、さらに神経疾患等の発症および進展に深く関与することが今日知られている。慢性炎症におけるプロセスには、免疫担当細胞の浸潤、血管新生、組織のリモデリング、そして線維化がある。近年、慢性炎症の波及に必須な脆弱な毛細血管の新生をターゲットにした研究が報告され始めている。

血管新生誘導因子の一つである angiogenin は、ヒト結腸癌細胞株 HT-29 の培養上清から単離されたアミノ酸 123 個からなる分子量 14.4 kDa の血管新生誘導因子である。そして、癌の増殖や転移に関与する血管新生において中心的な役割を果たすと考えられ、近年では、糖尿病や関節リウマチに代表される慢性炎症性疾患の発症や進展に angiogenin の関与が示唆され始めている。さらに、口腔内の慢性炎症性疾患である歯周炎罹患者の歯肉溝滲出液中においても、angiogenin の産生が亢進するとの報告がある。このように angiogenin が慢性炎症性疾患の発症および進展にも関与する可能性が示唆されるものの、詳細なメカニズムは未だ不明な点が多い。

一方、この angiogenin の産生を特異的に阻害する物質として報告されているものに、分子量 154.16 の有機物である terrein がある。これは、麹黴の仲間である *Aspergillus terreus* の代謝産物として発見されたもので、天然抽出物は前立腺癌細胞由来の LNCaP-CR 細胞における angiogenin の産生を有意に抑制する一方で、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の産生には影響を及ぼさないことが報告されている。

本研究では、口腔内の慢性炎症性疾患である歯周炎の病態に angiogenin が関与すると仮説を立てて研究を行った。

研究結果は、以下の内容であった。

- 1) HGFにおいて、angiogeninは恒常的に産生されており、その産生はIL-6/sIL-6Rの刺激によって亢進し、TNF- α によって抑制され、IL-1 β は影響を及ぼさなかった。なお、マクロファージ様細胞に分化誘導したTHP-1はangiogeninを産生しなかった。
- 2) 有機化学的に合成した(+)-terreinは20 μ Mまでは細胞障害性を示さず、IL-6/sIL-6R添加によって亢進したangiogeninの産生を抑制し、さらにIL-6/sIL-6RおよびIL-1 β の添加によって亢進したVEGFの産生を抑制した。また、IL-6/sIL-6R添加によって誘導されたSTAT3, ERK1/2, そしてJNK1/2のタンパク質のリン酸化を抑制した。

以上のことから、angiogenin は慢性炎症性疾患である歯周炎において病態悪化に関与している可能性が示唆された。また、線維芽細胞においてIL-6により亢進した angiogenin および VEGF の産生を(+)-terrein が平常時まで抑制することから、(+)-terrein には癌組織周囲に存在する正常組織からの血管新生誘導因子の提供を阻害する効果が期待できる。今回の成果は、癌のみならず慢性炎症における angiogenin を起点とした新しい治療ターゲット開発の一助となる。

以上に基づき、審査委員会は本申請論文が博士(歯学)の学位論文として価値があるものと認めた。